



**INSTITUTO POLITÉCNICO DE COIMBRA**

ESCOLA SUPERIOR AGRÁRIA

Dissertação apresentada à Escola Superior Agrária de Coimbra, Instituto Politécnico de Coimbra, para obtenção do grau de Mestre em Agricultura Biológica.

**Juglona :**  
**Avaliação do seu potencial efeito de fitotoxicidade**  
**e seu comportamento como herbicida natural**

João Amílcar Torres Correia  
Coimbra, 2012

INSTITUTO POLITÉCNICO DE COIMBRA  
ESCOLA SUPERIOR AGRÁRIA

Dissertação apresentada à Escola Superior Agrária de Coimbra, Instituto Politécnico de Coimbra, para obtenção do grau de Mestre em Agricultura Biológica.

Juglona :  
Avaliação do seu potencial efeito de fitotoxicidade  
e seu comportamento como herbicida natural

**Orientadores**

Interno: Professora Doutora Carmo Magalhães. Escola Superior Agrária de Coimbra, Departamento de Solos. Instituto Politécnico de Coimbra. Portugal

Externo: Engº Jorge Ferreira, Consultor.

Escrita ao Abrigo do Novo Acordo Ortográfico

Pouco conhecimento faz com que as pessoas se sintam orgulhosas.  
Muito conhecimento, que se sintam humildes.  
É assim que as espigas sem grãos erguem desdenhosamente a cabeça para o céu,  
enquanto as cheias as baixam para a terra, sua mãe  
**Leonardo da Vinci**  
**[1452-1519]**  
Pintor/Escultor/ Arquitecto/Músico/ Engenheiro/Cientista.

## ABSTRACT

One of the main constituents of the drupous fruit of the walnut tree is a juglone compound (5-hydroxy,4-naphthoquinone), which belongs to the group of quinones. During the harvesting process a residual liquid is produced called “tincture of walnut” in which the juglone compound is found in appreciable quantity.

The objectives of this research were to study the effects of different dilutions obtained from extracts of “tincture of walnut” from the drupous of the walnut (*Juglans regia* L.) on: a) plant growth of violets (*Saintpaulia ionantha*) and arbutus (*Arbutus unedo*) in tests *in vitro* and sweet sedge plants (*Cyperus rotundus*) in field trials; b) in germination process with seeds of: parsley (*Petroselinum crispum*), coriander (*Coriandrum sativum*), pastinaca (*Pastinaca sativa* L), evening primrose oil (*Oenothera biennis*), flax (*Linum usitatissimum*) and millions (*Echinochloa*).

Under the conditions of this study, it was found that the application of the extracts of “tincture of walnut” interfere in the growth of the plants: the leaves withered and become deformed, accompanied with necrosis. The first symptoms of the action of juglone were visible from 3-4 days after the application in all the tests carried out. There was also a tendency for an increase in the necrosis area with the increased amount of “tincture of walnut” applied. Germination tests showed the effect of “tincture of walnut” on linen and coriander.

The results from the tests carried out, lead us to conclude that the effect of the application of “tincture of walnut” as a natural herbicide, is dependent upon the treatment (quantity applied) and can be enhanced by the addition of an soaking agent.

**Keywords :** *Juglans regia* L, juglone, tincture of walnut, natural herbicide, *Cyperus rotundus*

## RESUMO

Um dos principais compostos presentes na casca verde da noz é a juglona, que é um pigmento natural do tipo das quinonas, reconhecido como sendo um dos compostos fenólicos mais fitotóxicos. Durante o processo de colheita da drupa da noqueira e obtenção da noz é produzido um resíduo líquido designado por tinta de noz no qual a juglona se encontra em quantidade apreciável.

O presente trabalho teve como objetivo estudar os efeitos de diferentes diluições obtidas a partir do extrato de tinta de noz proveniente das drupas da noqueira (*Juglans regia* L) no crescimento vegetal de: a) plantas de violeta (*Saintpaulia ionantha*) e de medronheiro (*Arbutus unedo*) em ensaios *in vitro*; b) de plantas de junça (*Cyperus rotundus*) em ensaios de campo; c) no processo de germinação com as espécies salsa (*Petroselinum crispum*), coentro (*Coriandrum sativum*), pastinaca (*Pastinaca sativa* L), onagra (*Oenothera biennis*), linho (*Linum usitatissimum*) e milhã (*Echinochloa*).

Nas condições deste estudo, constatou-se que a aplicação do extrato de tinta de noz provocou a ocorrência de necroses (% de área foliar necrosada), visíveis nos ensaios *in vitro* e de campo, no 3º dia após a aplicação, e ainda que a adição de um adjuvante realçou aquele efeito, no caso da violeta (*Saintpaulia ionantha*). Verificou-se também a tendência para um aumento da área necrosada com o aumento da quantidade de tinta de noz aplicada. No ensaio de germinação apenas se verificou o efeito biocida do extrato de tinta de noz no linho e no coentro.

As respostas obtidas nos ensaios efetuados levam-nos a concluir que o efeito da tinta de noz como herbicida de contato, depende da quantidade aplicada, da espécie em causa e pode ser potenciada pela adição de um adjuvante.

**Palavras chave:** *Juglans regia* L, juglona, tinta de noz, herbicida biológico, *Cyperus rotundus*

## INDICE

<b>1 Introdução.....</b>	<b>1</b>
1.1 A agricultura biológica e o controlo de infestantes.....	1
1.2 A noqueira ( <i>Juglans regia</i> ).....	4
1.3 Objetivos.....	9
<b>2. Materiais e métodos.....</b>	<b>10</b>
2.1 Obtenção, identificação e quantificação da tinta de noz.....	10
2.2 Ensaios para estudo do efeito biocida da juglona presente na tinta de noz.....	11
2.2.1 Efeito da quantidade de extrato de tinta de noz no crescimento vegetal	
Ensaios <i>in vitro</i> .....	11
2.2.3 Efeito da quantidade de extrato de tinta de noz no crescimento vegetal	
Ensaios de campo .....	11
2.3 Tratamento de dados .....	17
<b>3. Resultados e discussão.....</b>	<b>18</b>
3.1 Identificação, separação e obtenção da juglona .....	18
3.2 Efeito biocida da juglona presente na tinta da noz.....	19
3.2.1 Efeito da quantidade de extrato de tinta de noz no crescimento vegetal	
Ensaios <i>in vitro</i> .....	19
3.2.2 Efeito do extrato de tinta de noz na germinação de sementes –	
Ensaios <i>in vitro</i> .....	30
3.2.3 Efeito da aplicação de extrato de tinta de noz no crescimento vegetal	
Ensaios de campo .....	36

<b>4. Conclusões.....</b>	<b>50</b>
<b>5. Considerações finais.....</b>	<b>52</b>
<b>6. Bibliografia.....</b>	<b>56.</b>
<b>7. Anexos.....</b>	<b>64</b>
7.1 Dados de análise estatística.....	65
7.2 Registo fotográfico de uma colheita numa exploração de nucicultura .....	80

## Lista das figuras

Figura 1.Estrutura química da juglona.....	pág.1
Figura 2.Organização dos tecidos e das células de uma drupa.....	pág.8
Figura 3.Processo de descasque da drupa da noqueira.....	pág.10
Figura 4.Tubo de ensaio com planta de violeta ( <i>Saintpaulia ionantha</i> )...	pág.12
Figura 5.Metodologia utilizada para contagem do número de sementes germinadas.....	pág.14
Figura 6. Ensaio1 com a junca ( <i>Cyperus rotundus</i> ) no campo do caldeirão / ESAC.....	pág.14
Figura 7. Desenho experimental do Ensaio 1 com a junca ( <i>Cyperus rotundus</i> ) no campo do caldeirão / ESAC.....	pág.15
Figura 8. Método de observação fotográfica utilizado para a atribuição de percentagem de área foliar necrosada.....	pág.15
Figura 9. Desenho experimental do Ensaio 2 com a junça ( <i>Cyperus rotundus</i> ) no campo do caldeirão / ESAC.....	pág.16
Figura 10. Observação da planta para atribuição de um valor percentual de área foliar necrosada.....	pág.16
Figura 11. Cromatogramas ( HPLC) de juglona presente na solução padrão ( a) e no extracto de tinta de noz ( b).....	pág.18
Figura 12.Observações efetuadas, no dia da aplicação (a) e 3 semanas após (b), das 15 plantas de violeta ( <i>Saintpaulia ionantha</i> ) tratadas com 0,1 mL (1; 2; 3; 4 e 5); 0,3mL (6; 7; 8; 9 e 10) e 1,0 mL (11;12;13;14 e 15), de extrato de tinta de noz.....	pág.20
Figura 12b. Observações efetuadas, no dia da aplicação (a) e 3 semanas após (b), das 10 plantas de violeta ( <i>Saintpaulia ionantha</i> ), tratadas com 0,5 mL (16; 17; 18; 19 e 20) e 0 mL (21; 22; 23; 24 e 25), de extrato de tinta de noz.....	pág. 21



Figura 13a. Quantificação do efeito (% de necroses) da aplicação do extrato de tinta de noz em plantas de violeta (*Saintpaulia ionantha*). Observações 3 semanas após o tratamento com: 0,1 mL (1, 2, 3, 4 e 5); com 0,3 mL (6, 7, 8, 9 e 10); com 0,5 mL (11,12,13,14 e 15) e com 1,0 mL(16, 17,18, 19 e 20).....pág.22

Figura 13b. Quantificação do efeito (% de necroses) da aplicação do extrato de tinta de noz em plantas de violeta (*Saintpaulia ionantha*). Observações 3 semanas após o tratamento com 0 mL - 21, 22, 23, 24, 25.....pág.23

Figura 14a. Observações efetuadas, no dia da aplicação (a) e 14 dias depois (b), das 15 plantas de violetas (*Saintpaulia ionantha*) tratadas com 1 mL (1, 2, 3, 4 e 5); com 2 mL (6, 7, 8, 9 e 10) e com 3 mL (11, 12, 13, 14 e 15) de extrato de tinta de noz e adjuvante “Tween20”.....pág.25

Figura 14b. Observações efetuadas, no dia da aplicação (a) e 14 dias depois (b), das 15 plantas de violetas (*Saintpaulia ionantha*) tratadas com 0 mL (16, 17, 18, 19 e 20) de extrato de tinta de noz e adjuvante “Tween20”.....pág.26

Figura 15. Efeito da aplicação (% de necroses) do extrato de tinta de noz com adjuvante “Tween20”, em plantas de violeta (*Saintpaulia ionantha*). Observações 14 dias após a aplicação de 1 mL - plantas 1, 2, 3, 4 e 5; 2 mL - plantas 6, 7, 8, 9 e 10; 3 mL – plantas 11, 12, 13, 14 e 15; 0 mL - plantas 16, 17, 18, 19 e 20.....pág.27

Figura 16. Efeito da aplicação (% de necroses) do extrato de tinta de noz e adjuvante “Tween20”, em plantas de medronheiro (*Arbutus unedo*). Aplicação de 0 mL (19, 20, 21) e de 4,0 mL (16, 17 e 18).....pág.30

Figura 16a. Efeito da aplicação de 0 mL, 1,0 mL e 3,0 mL de extrato de tinta de noz na germinação de coentro, onagra e linho, 14 dias após a aplicação.....pág.32

Figura 16b.Efeito da aplicação de 0 mL,1,0 mL e 3,0 mL de extrato de tinta de noz na germinação de milhã, salsa e pastinaca, 14 dias após a aplicação.....pág.33

Figura 17a. Efeito do extrato de tinta de noz nos talhões 1, 2, 3 e 4 com junça (*Cyperus rotundus*). Observações 3 e 20 dias após a aplicação.....pág.37

Figura 17b. Efeito do extrato de tinta de noz nos talhões 5, 6, 7 e 8 com junça (*Cyperus rotundus*). Observações 3 e 20 dias após a aplicação.....pág.38

Figura 17c. Efeito do extrato de tinta de noz nos talhões 9, 10, 11 e 12 com junça ( <i>Cyperus rotundus</i> ). Observações 3 e 20 dias após a aplicação.....	pág.39
Figura 17d. Efeito do extrato de tinta de noz nos talhões 13, 14, 15 e 16 com junça ( <i>Cyperus rotundus</i> ). Observações 3 e 20 dias após a aplicação.....	pág.40
Figura 18. Histograma com o número de plantas por classe de superfície necrosada.....	pág.42
Figura 19a. Efeito da aplicação de extrato de tinta de noz em plantas individuais (A,B,C,D,E e F) de junça ( <i>Cyperus rotundus</i> ). Observações no dia da aplicação e 5 e 14 dias depois.....	pág.43
Figura 19b. Efeito da aplicação de extrato de tinta de noz em plantas individuais (G,H,I,J,L e M) de junça ( <i>Cyperus rotundus</i> ). Observações no dia da aplicação e 5 e 14 dias depois.....	pág.44
Figura 19c. Efeito da aplicação de extrato de tinta de noz em plantas individuais (N,O,P,Q,R e U) de junça ( <i>Cyperus rotundus</i> ). Observações no dia da aplicação e 5 e 14 dias depois.....	pág.45
Figura 19d. Efeito da aplicação de extrato de tinta de noz em plantas individuais (V e X) de junça ( <i>Cyperus rotundus</i> ). Observações no dia da aplicação e 5 e 14 dias depois.....	pág.46
Figura 20a. Quantificação do efeito (% de necroses) da aplicação do extrato de tinta de noz, nas plantas A, B, C, D, E e F de junça ( <i>Cyperus rotundus</i> ). Observações efetuadas 14 dias após a aplicação.....	pág.47
Figura 20b. Quantificação do efeito (% de necroses) da aplicação do extrato de tinta de noz, nas plantas G, H, I, J, L, M, N e O de junça ( <i>Cyperus rotundus</i> ). Observações efetuadas 14 dias após a aplicação.....	pág.48
Figura 20c. Quantificação do efeito (% de necroses) da aplicação do extrato de tinta de noz, nas plantas P, Q, R, U, V e X, de junça ( <i>Cyperus rotundus</i> ). Observações efetuadas 14 dias após a aplicação.....	pág.49

## Lista dos quadros

**Quadro 1.** Ocorrência de necroses (%) em plantas de violeta (culturas *in vitro*), três semanas após a aplicação de 0; 0,1; 0,3; 0,5 e 1,0 mL do extrato de tinta de noz. Os valores são a média  $\pm 1$  desvio-padrão (n=25).....pág.19

**Quadro 2.** Ocorrência de necroses (%) nas plantas de violeta (*Saintpaulia ionantha*), após a aplicação de 0, 1, 2 e 3 mL do extrato de tinta de noz. Os valores são a média  $\pm 1$  desvio-padrão (n=25).....pág.24

**Quadro 3.** Ocorrência de necroses (%) nas plantas de medronheiro (*Arbutus unedo*), após a aplicação de 0 e 4 ml do extrato de tinta de noz. Os valores são a média  $\pm 1$  desvio-padrão (n=6).....pág.29

**Quadro 4.** Efeito do extrato de tinta de noz, na germinação de sementes. Os resultados são a média  $\pm 1$  desvio padrão, com n=50.....pág.31

**Quadro 5.** Número de sementes germinadas, de coentro, linho, onagra, salsa, pastinaca e milhã, tratadas com 0, 1,0 e 3,0 mL de extrato de tinta de noz.....pág.34

**Quadro 6.** Necroses (%) observadas nas plantas de junça (*Cyperus rotundus*), 20 dias após a aplicação de 0, 10, 30 e 50mL de extrato de tinta de noz. Os resultados são a média  $\pm 1$  desvio padrão, com n=16.....pág.36

## **Lista dos anexos**

Anexo 1. Dados de análise estatística.....	pág.65
Anexo 2. Registo fotográfico de uma colheita numa exploração de nucicultura.....	pág.80

### **Lista das abreviaturas**

HPLC - high performance liquid chromatography – Cromatografia Líquida de Alta Pressão.

ANOVA – analysis of variance – análise da variância

ESAC - Escola Superior Agrária de Coimbra

## **Agradecimentos**

*As palavras ganham um novo sentido quando inquietam o pensamento. E tornam-se sempre insuficientes quando com elas, queremos dizer o que nos vai para lá da alma. Nada se faz sem apoio, sem recursos e sem crédito. Desses três elementos, o mais cruel de se conquistar é o crédito. Não um crédito bancário, mas um crédito que vem da confiança depositada nas pessoas.*

*Uma dissertação, apesar do processo solitário a que qualquer investigador está destinado, reúne contributos de várias pessoas. Desde o início deste trabalho, contei com a confiança e o apoio de inúmeras pessoas e com a Escola Superior Agrária de Coimbra - onde um dia me fiz homem. Sem esses contributos, esta investigação não teria sido possível.*

*Por essa razão, desejo expressar agradecimento à Mila e ao Tim pelo modo como me aturaram quando eu estava, e sobretudo como aceitaram que, muitas vezes, eu não estivesse.*

*À Professora Carmo porque tive o privilégio de trabalhar de perto e multiplicou as minhas poucas horas disponíveis;*

*À Professora Filomena Gomes pela precisão de raciocínio e profundo conhecimento da natureza humana;*

*Ao Professor Varejão, pelo apoio laboratorial, pelos conselhos e críticas fundamentais;*

*Ao Eng. Filipe Melo pelo apoio prestado e pelo pensar com outro olhar;*

*À Professora Maria José, pelo apoio em documentos bibliográficos de interesse, contatos estabelecidos entre instituições e manifestando entusiasmo pelo trabalho que eu desenvolvia;*

*Ao Eng. Jorge Ferreira pelo seu apoio*

*e por fim,*

*À Escola Superior Agrária de Coimbra e a sua comunidade escolar pelo apoio, excelentes condições de trabalho que me proporcionaram e colaboração prestados.*